



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

T-chip 플랫폼을 이용한 혈청 내 암 진단 바이오마커 MMP-2 검출

Detection of MMP-2 in human serum as the
biomarker of colorectal cancer
using the T-chip platform

2017 년 8 월

서울대학교 대학원

전기정보 공학부

이 용 은

T-chip 플랫폼을 이용한 혈청 내 암 진단 바이오마커 MMP-2 검출

Detection of MMP-2 in human serum as the
biomarker of colorectal cancer
using the T-chip platform

지도 교수 박 영 준

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2017 년 8 월

서울대학교 대학원
전기정보 공학부
이 용 은

이용은의 공학석사 학위논문을 인준함
2017 년 8 월

위 원 장 이 중 호 (인)

부위원장 박 영 준 (인)

위 원 신 동 식 (인)

초 록

대장암을 비롯한 다양한 암의 중요 바이오마커(biomarker) 중의 하나인 Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)를 실제 사람 혈청(human serum) 속에서 T-chip 플랫폼을 이용하여 전기적으로 측정함으로써 개인 진단이 가능하게 하였다.

T-chip 플랫폼은 island electrode와 enclosing electrode의 2전극 구조로서 면적이 1,000배 이상 차이 나기 때문에 수용액에 대한 전기 이중층(electrical double layer)의 커패시턴스(capacitance) 차이로 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 고정됨으로써 수용액의 전위가 안정하게 유지되었다.

MMP-2의 효소 역할을 통해 분자 체인이 끊어진다고 알려진 펩타이드(peptide)를 금 전극에 고정화 하였고, peptide 말단에는 산화 환원 리포터(redox reporter) 역할을 하는 메틸렌 블루(Methylene blue, MB)를 합성하여서 금 전극과 tunneling 전류의 변화를 측정하였다.

본 연구에서는 전극에 고정화된 MB-peptide가 혈청 속에 들어 있는 MMP-2에 의해 잘렸을 때의 전극과 methylene blue 사이 전자의 이동, 즉 tunneling 전류가 감소하는 것을

확인하였다. 이러한 특성을 이용하여 혈청 속에서 다양한 바이오마커를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있는 바이오센서 플랫폼이 될 것이다.

주요어 : MMP-2, 메틸렌 블루, 혈청, 바이오센서, 터널링 전류

학 번 : 2015-22801

목 차

초록	i
목차	iii
그림 목차	v
제 1 장 서 론	1
1.1 연구의 배경	1
1.2 연구의 목적	8
1.3 논문의 구성	9
제 2 장 실험 설계.....	10
2.1 Peptide substrate for MMP-2	10
2.2 Tunneling state로서의 Methylene blue (MB)	11
2.3 센서 소자 구조	13
2.4 MB-peptide 기반 MMP-2 검출 센서 제작.....	16
제 3 장 결과 및 분석.....	19
3.1 MB-peptide 기반 tunneling biosensor의 전류 특성 분석 .	19
3.2 전압 인가에 따른 MB-peptide biosensor의 energy state 변화	21

3.3 Human serum 에서의 control 실험.....	25
3.4 Human serum 속 MMP-2 농도에 따른 변화.....	28
 제 4 장 결론과 앞으로 연구 제안.....	 30
 참고문헌.....	 32
 Abstract	 34

그림 목차

[그림 1] Biosensor system.....	2
[그림 2] Electrochemical Biosensor	3
[그림 3] 2015년 암종별 사망자수 : 남녀전체	5
[그림 4] 종양세포 속에서 MMP-2 분비 과정	7
[그림 5] Peptide substrate for MMP-2	10
[그림 6] Methylene blue가 합성된 peptide.....	11
[그림 7] Methylene blue-Leucomethylene blue의 산화환원 mechanism	12
[그림 8] 소자의 구조. (측면에서 본 모습, 위에서 본 모습).....	13
[그림 9] (a) 동심원 구조 전극 소자의 등가 회로와 수용액의 전위를 결정하는 수식. (b) enclosing electrode와 island electrode 전압 sweep에 대한 수용액의 전 위 측정.....	15
[그림 10] MB-peptide based MMP-2 biosensor 모습.	17
[그림 11] (a) 금 전극에 MB-peptide가 고정화 되어있는 상 태, (b) 고정화된 MB-peptide와 MMP-2의 반응 이후의 상태	18

[그림 12] MB-peptide biosensor 제작 과정별 전류 변화 그래프, (a) bare electrode에서 측정한 전류 그래프, (b) MB-peptide와 MCH를 고정화 시킨 뒤 측정한 전류 그래프.	20
[그림 13] MB-peptide biosensor의 energy state, (a) 전압이 인가되지 않은 초기 상태, (b) -0.3 V를 5초 동안 인가한 후의 상태	22
[그림 14] MB-peptide biosensor의 energy state, (a) -0.3 V를 5초 동안 인가한 후의 상태, (b) 0.2V까지 positive voltage sweep을 진행한 후의 상태	23
[그림 15] Cyclic voltammetry 측정 시, 전압 sweep에 따른 전류 성분 분석	24
[그림 16] (a) MB-peptide와 human serum간의 반응, (b) MB-peptide와 human serum을 30분 동안 반응시킨 후의 전류 그래프, (c) Tween-20으로 wash 후 초기의 전류 값으로 회복되는 그래프.....	26
[그림 17] 다양한 농도의 MMP-2와 uPA를 떨어뜨린 뒤 peak점에서의 실시간 전류 변화 그래프	29
[그림 18] 반응이 끝난 이후의 peak점에서의 전류 변화 그래프.....	30

제 1 장 서 론

1.1 연구의 배경

1.1.1 바이오센서(Electrochemical biosensor)의 정의

바이오센서(biosensor)는 1962년 Leland C. Clark이 효소 전극(enzyme electrode)을 이용하여 포도당을 감지하여 최초의 글루코즈센서를 개발한 이래로 발전을 거듭하고 있다. 바이오센서란 생체감지물질(bioreceptor), 신호 변환기(signal transducer), 그리고 이 신호들을 후처리 해주는 processor로 구성되어 있으며 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 감지할 수 있는 바이오 소자 라고 할 수 있다 (그림 1) [1, 2].

생체감지물질로는 검출하고자 하는 target 물질과의 반응을 통해서 신호 변환기로 측정하게 될 신호를 발생하는 물질을 말한다. 대표적으로는 효소(enzyme), 핵산(nucleic acid), 항원/항체(antigen/antibody), 세포(cell) 등이 있다.

신호변환 방법으로는 전기화학(electrochemical), 형광, SPR(surface plasmon resonance), FET(field-effect transistor), QCM(quartz crystal microbalance) 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다.

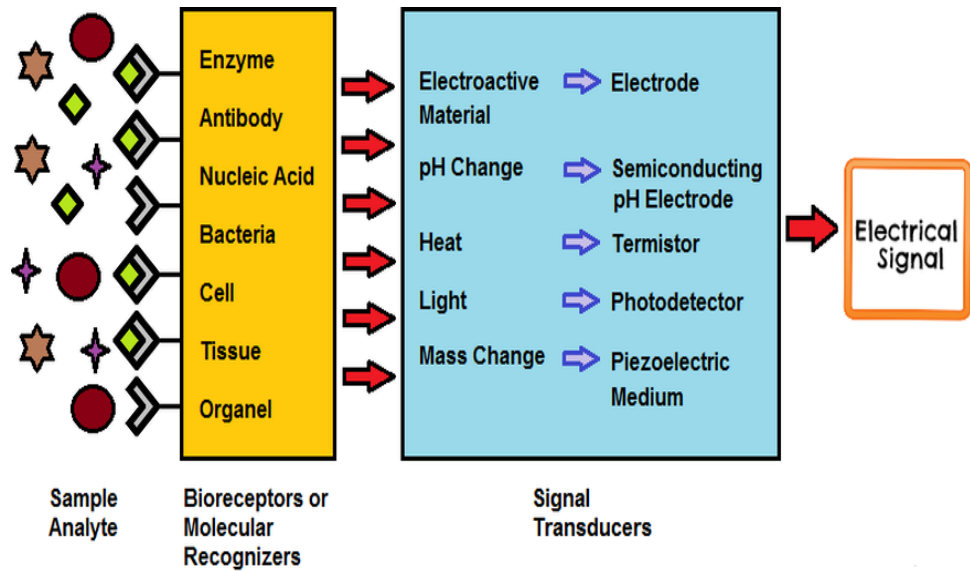


그림 1. Biosensor system

전기화학적 바이오센서에서는 전극을 신호변환기로 사용함으로써 검출하고자 하는 target의 특정 정보를 전기적 신호로 직접 변화시키는 센서를 말한다.

즉, 생체감지물질을 전극 표면에 고정 시켜 검출하고자 하는 target과의 생물학적 인식현상을 정량적인 전류 혹은 전위 변화로 변화시키는 장치를 말한다. 대부분의 전기화학적 바이오센서는 그림 2와 같이 전기적 자극에 대하여 전극과 bioreceptor 사이의 전자의 이동(산화 환원 반응)을 측정한다. 이러한 산화 및 환원 반응을 redox 반응이라 하며, 이것에 대한 연구는 target의 농도, 평형 상수, 반응 계수뿐만 아니라 전극 표면에서 일어나는 전자의

tunneling 현상, 물질의 흡착 등 여러 가지 현상에 대한 많은 정보를 알려 준다. 전기화학적 바이오센서에서는 일반적으로 전압(v), 전류(i), 전하량(Q), 시간(t) 등의 변수를 측정하여 원하는 물질을 검출하게 된다. 이러한 전기화학적 측정법에는 순환 전압 전류법(cyclic voltammetry), 선형주사전위법(Linear Sweep Voltammetry), 시간대 전류법(chronoamperometry), 시간대 전하법(chronocoulometry), 전기화학 분광분석법(electrochemical Impedance spectroscopy)등 다양한 측정법이 있다 [1, 2].

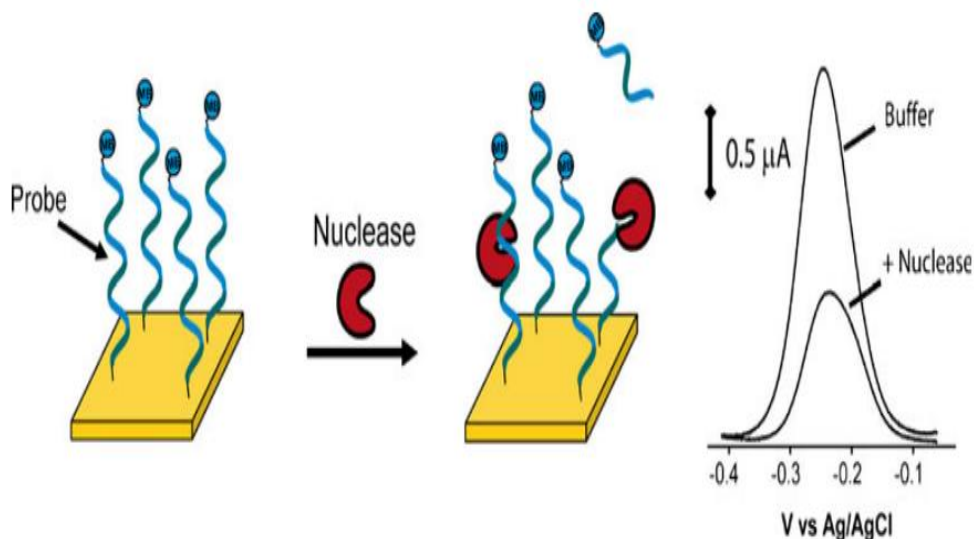


그림 2. Electrochemical Biosensor

1.1.2 암(cancer) 진단의 필요성

인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위를 세포(cell)라고 부른다. 정상적으로 세포는 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하며 세포 수의 균형을 유지한다.

그러나 여러 가지 이유로 인해 세포의 유전자에 변화가 일어나면 비정상적으로 세포가 변하여 불완전하게 성숙하고, 과다하게 증식하게 되는데 이를 암(cancer)이라 정의한다. 또한, 암에는 주위 조직 및 장기에 침입하고 이들을 파괴할 뿐 아니라 다른 장기로 퍼져 갈 수 있는 특징이 있다. 암은 억제가 안되는 세포의 증식으로 정상적인 세포와 장기의 구조와 기능을 파괴하기에 그 진단과 치료의 중요성이 더 강조되고 있다.

국가암정보센터에 따르면 2014년 가장 많이 발생한 암은 갑상선암이었으며, 이어서 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 간암 순으로 많이 발생하는 것으로 나타났다. 특히 2015년에는 암으로 사망한 사람은 총 76,855명으로 전체 사망자의 27.9%가 암으로 사망하고 있다 [3]. 사망률이 가장 높은 암종은 폐암(전체 암 사망자의 22.6%인 17,399명)이었으며 다음으로는 간암(14.7%), 위암(11.1%), 대장암(10.9%) 순이었다 (그림 3) [3].

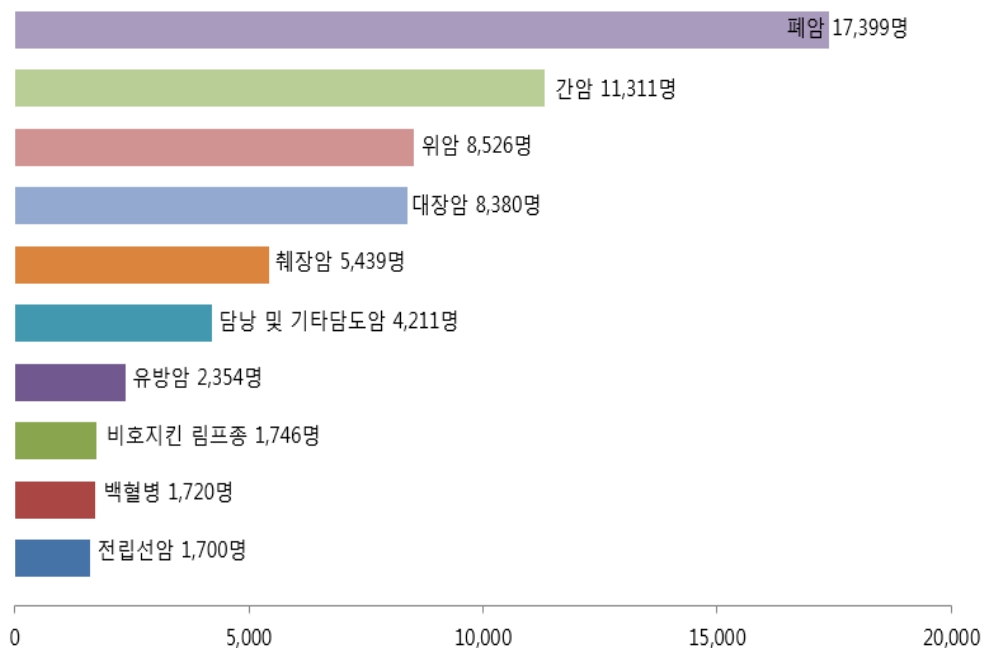


그림 3. 2015년 암종별 사망자수 : 남녀전체

이처럼 사망률의 큰 비중을 차지하는데 암으로 인해 나타나는 징후와 증상의 초기 단계에는 특별한 증상이 없는 경우가 많다. 또한, 증상이 비특이적이기 때문에 다른 질환과의 구분도 어렵다. 그러나 암이 자라면서 주위의 기관, 구조물, 혈관, 신경을 압박하게 되며 여러 징후와 증상이 나타나게 되는데 일반적으로 이러한 경우에 발견을 하게 되면 이미 암을 치료하기에는 늦은 상태이다. 그래서 암의 조기 진단이 매우 중요하다.

1.1.3 암 진단 바이오마커로 Matrix metalloproteinase-2

(MMP-2)를 사용하는 이유.

암 세포가 성장하여 침습, 전이를 일으키기 위해서는 암 세포 침습에 일차적인 장벽 역할을 하는 기저막 및 세포외기질의 분해과정이 필수적이기 때문에 암 세포는 다양한 단백질 분해효소를 분비한다. 단백질 분해효소에는 여러 종류가 있는데 특히 matrix metalloproteinases (MMPs)가 암 세포의 침습과 전이 과정 중에 매우 중요한 역할을 하는 분해효소로 알려져 있다[4-7].

MMPs는 현재까지 약 23종류(MMP-1, MMP-23)가 발견되었으며, 그 중, MMP-2의 과발현은 대장암과 유방암등의 진행과 연관이 있다 [8-14]. MMP-2는 일반적으로 종양세포에서 분비가 되며 분비된 MMP-2는 혈관 속으로 침투하게 된다. 그 후, 혈관 속에서 혈액을 타고 몸 속 전체로 이동하며 뼈나 여러 장기들을 감염시키게 되어서 사람이 암에 걸리게 된다 (그림 4) [15-17]. 그래서 MMP-2가 대표적 암 진단 바이오마커로 널리 알려져 있다 [18-21].

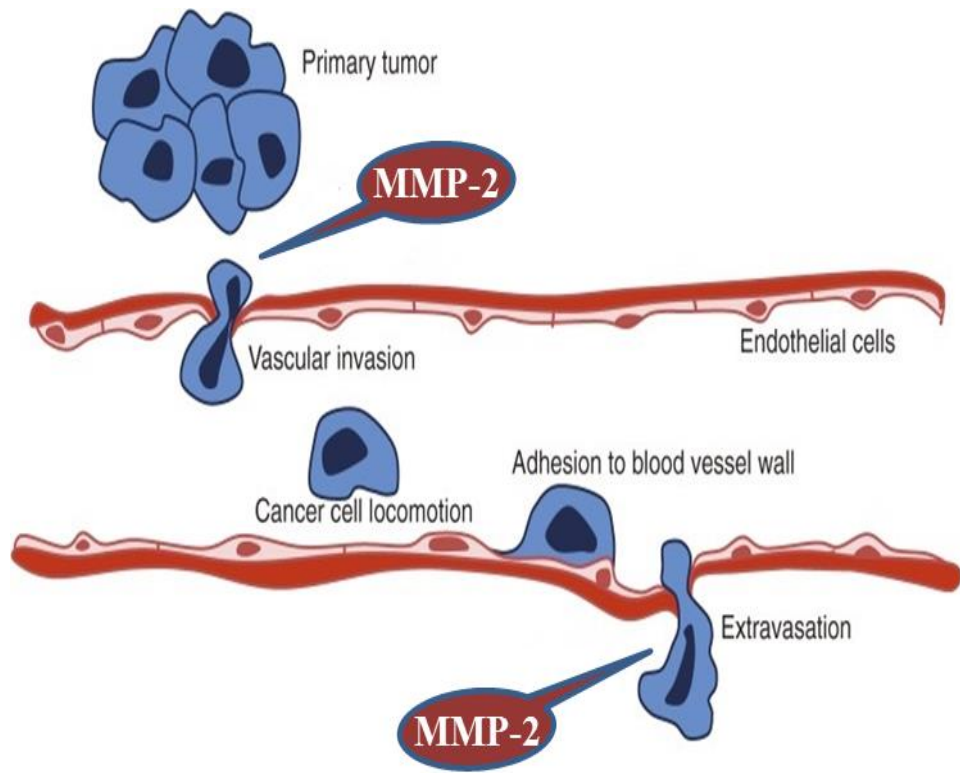


그림 4. 종양세포 속에서 MMP-2 분비 과정

현재까지 의학계에서는 대장암 진단에 있어 human serum 속에서 MMP-2의 cut-off 농도를 약 2nM 정도로 보고있다 [11].

1.2 연구의 목적

본 연구에서는 개인 암 진단용 칩 구현에서

- 전기적 진단
- human serum 속에서의 바이오마커 검출

을 만족 할 수 있는 바이오센서의 가능성을 탐색하기 위하여

암 진단 바이오마커인 MMP-2를 동심 구조 전극과 MB가 합성된 peptide (MB-peptide)를 이용해 정량적으로 검출할 수 있는 전기적 tunneling current biosensor를 구현하고자 한다. 기존의 전기화학적 biosensor는 전위를 유지시키기 위한 기준 전극을 사용해야 하지만 본 연구에서 사용한 동심 구조 전극의 특징을 이용하여 기준 전극을 사용하지 않고 간단하게 구현 가능하다는 장점을 가지고 있다.

이러한 목적을 달성하기 위해 MB가 합성된 peptide를 전극에 고정화 시킨 뒤, 기준 전극 없이 용액의 전위를 잡아주는 enclosing electrode를 0V로 고정하고, 검출하고자 하는 target인 human serum 속 MMP-2와의 반응을 확인할 island electrode에 전압을 가해주어 MB-peptide와 전극 표면 사이에서의 전자의 tunneling 현상을 tunneling current 측정을 통해서 확인한다.

1.3 논문의 구성

본 논문의 구성은 다음과 같다. 2장에서는 소자의 구조와 MMP-2를 검출하기 위한 필요한 중요 요소들에 대해서 설명한다. 2.1장은 검출하고자 하는 MMP-2에 특이적으로 반응하는 peptide, 2.2장은 전자의 tunneling state 역할을 하는 Methylene blue에 대한 소개, 2.3장은 센서로 사용되는 소자 구조에 대한 설명, 2.4장에서는 MMP-2 검출 센서 제작 과정, 3장에서는 MMP-2가 들어있지 않은 Human serum만을 이용한 Control 실험과 MMP-2가 들어있는 Human serum을 이용하여 측정한 실험 결과에 대한 내용을 설명하고, 4장에서는 결과와 앞으로의 연구 제안으로 논문을 마친다.

제 2 장 실험 설계

2.1 Peptide substrate for MMP-2

본 연구에서는 MMP-2와 특이적으로 반응하는 peptide를 금 전극 (Au electrode)에 고정화 시키고 MMP-2가 peptide와 반응을 할 때 변하는 tunneling 전류를 측정한다.

본 연구에서 사용 되어진 peptide는 다음과 같다.

MMP-2 peptide sequence :

Glycine (Gly) – Proline (Pro) – Leucine (Leu) – Glycine (Gly) –
Methionine (Met) – Tryptophan (Trp) – Serine (Ser) –
Arginine (Arg) – Cysteine (Cys)

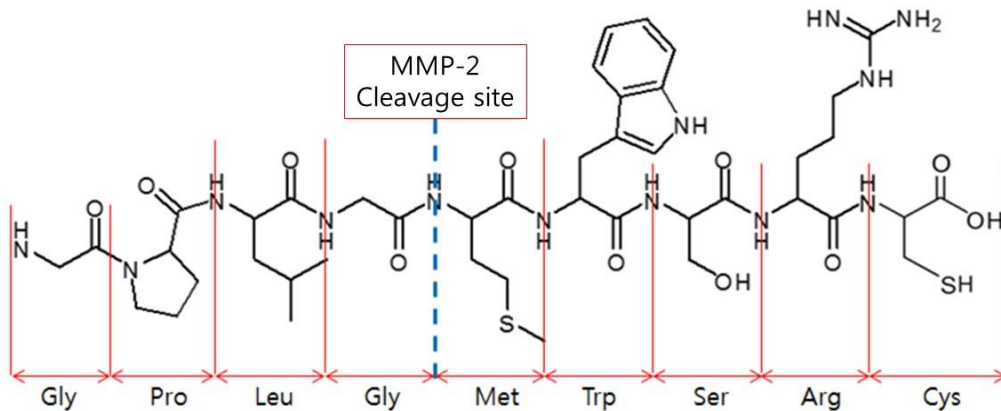


그림 5. Peptide substrate for MMP-2

2.2 Tunneling state 로서의 Methylene blue (MB)

Methylene blue는 헤테로 고리 방향족 화합물로 상온에서는 짙은 녹색을 띄며, 산화 시 푸른색, 환원 시 무색을 띄는 특징을 가지고 있기 때문에 주로 산화 환원의 지표로 사용된다.

본 실험에서는 Methylene blue를 그림 5에서의 peptide의 Gly 부분에 합성하여 전극에서 전자의 tunneling을 가능하게 해주는 tunneling state로 사용한다 (그림 6).

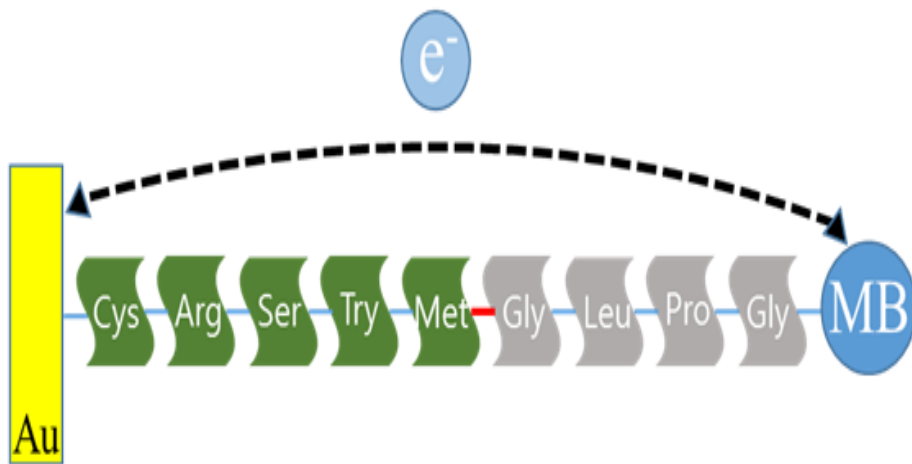


그림 6. Methylene blue가 합성된 peptide

Methylene blue는 전자 2개와 수소 한 개를 받아 Leucomethylene blue로 환원 되게 되고 반대로 Leucomethylene blue에서 전자 2개와 수소 한 개를 내어 놓게 되면 산화가 되어 Methylene blue로 바뀌게 되는 mechanism을 그림 7에서 나타내었다.

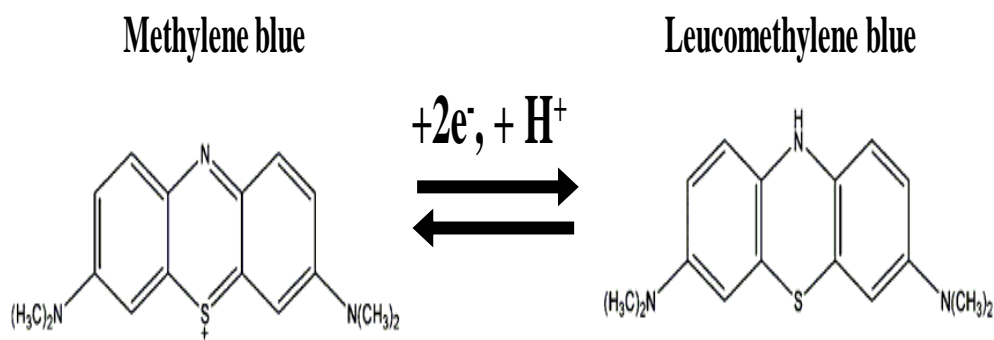


그림 7. Methylene blue – Leucomethylene blue의 산화환원 mechanism

2.3 센서 소자 구조

본 연구에서 사용하게 될 소자는 실리콘 기판 위에 $1\mu\text{m}$ 두께의 실리콘 산화막이 길러져 있고 그 위에 200nm 두께의 금을 증착하여 전극으로 사용한다. 측면에서 본 소자의 모습과 위에서 본 소자의 모습은 다음과 같다 (그림 8).

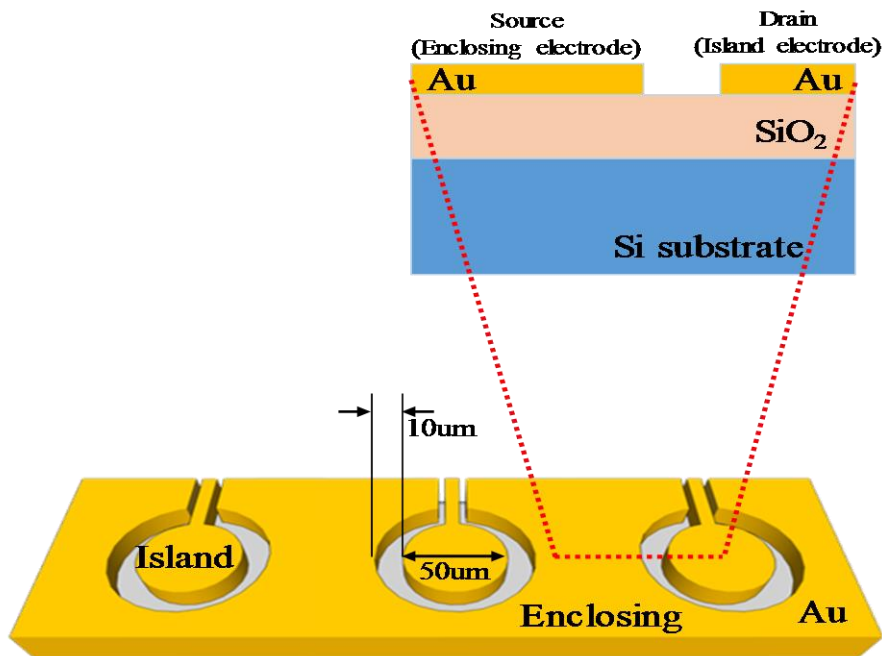
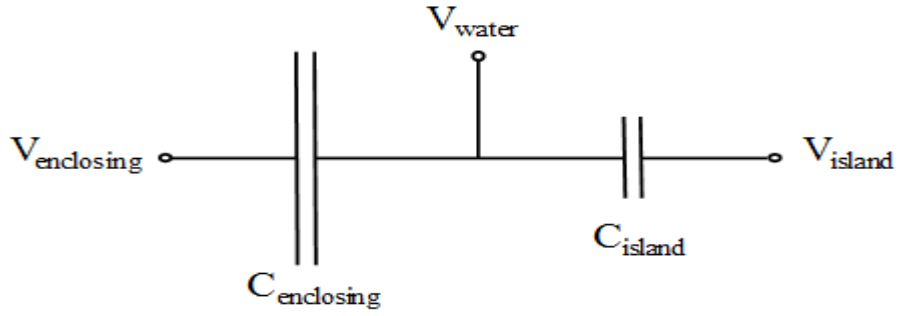


그림 8. 소자의 구조 (측면에서 본 모습, 위에서 본 모습)

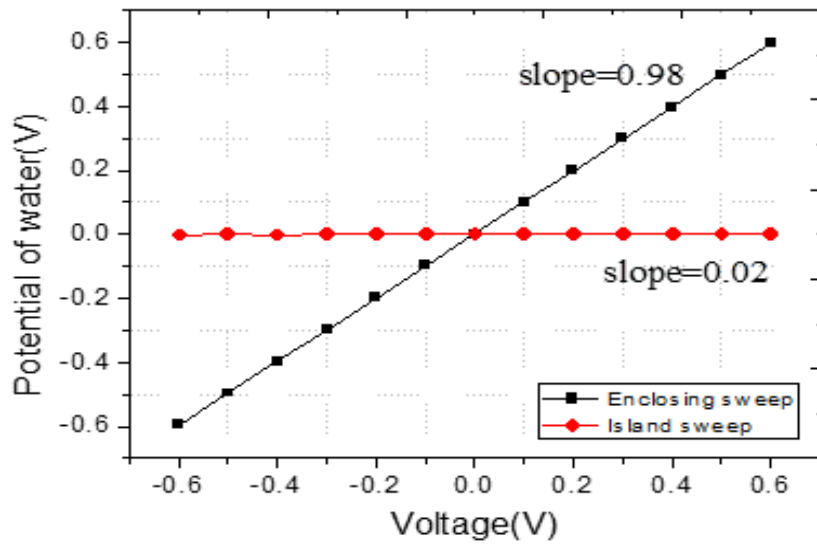
그림 8 에서 보듯이 금 전극은 island electrode와 이를 둘러싸고 있는 enclosing electrode로 이루어져 있다. Island electrode의 지름은 $50\mu\text{m}$ 이고 enclosing electrode는 island electrode로부터 약 $10\mu\text{m}$ 떨어져있고 island electrode의 면적에 비해 약 1000배 이상의 큰 넓이 차이를 띄고 있다.

소자에 떨어뜨리는 수용액의 전위는 수용액과 전극 사이에 생성되는 Electrical double layer (EDL) capacitance 값에 따라 결정 되는데, 상대적으로 island electrode보다 enclosing electrode의 면적이 매우 크기 때문에 EDL capacitance 값도 그만큼 커지게 된다. 따라서 간단한 등가 회로와 수식 (그림 9(a))을 통해서 확인해 보면 수용액의 전위는 enclosing electrode의 전압에 지배를 받게 된다 [22,23]. 그림 9(b)는 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 지배 받는 것을 실험을 통해 확인한 그래프 이다. Island electrode를 0V로 고정시키고 enclosing electrode의 전압을 $-0.6\text{V}\sim 0.6\text{V}$ 까지 sweep 하였을 때 수용액의 전위를 측정하면 기울기는 0.98이고, 반대로 enclosing electrode의 0V로 고정시키고 island electrode의 전압을 sweep 하였을 때의 그래프 기울기는 0.02이다. 결과를 통해서 수용액의 전위가 enclosing electrode의 전압에 강하게 지배 받는 것을 확인 할 수 있었고, 이러한 특징을 통해서 외부 전극 없이 실험을 진행 할 수 있었다.



$$V_{water} = \frac{1}{1 + \frac{C_{island}}{C_{enclosing}}} V_{enclosing}$$

(a)



(b)

그림 9. (a) 동심원 구조 전극 소자의 등가 회로와 수용액의 전위를 결정하는 수식, (b) enclosing electrode와 island electrode 전압 sweep에 대한 수용액의 전위 측정

2.4 MB-peptide 기반 MMP-2 검출 센서 제작

이번 장에서는 methylene blue가 합성된 peptide를 이용하여 MMP-2 검출 biosensor 제작 과정과 원리에 대해 말하고자 한다. 앞서 소개한 소자에서 MMP-2를 검출하기 위해서는 소자의 금 전극 위에 redox reporter인 methylene blue가 합성된 peptide를 고정시켜야 한다. 가루 상태의 MB-peptide에 Dimethyl sulfoxide (DMSO)을 이용하여 희석 시켜서 MB-peptide 용액을 만들었다. 이 용액을 소자에 incubation 시키기 위해 Polydimethylsiloxane (PDMS)를 이용하여 well을 만들어 MB-peptide $1\ \mu\text{M}$ 을 떨어뜨려 12시간 이상 반응시켰다. 이 과정을 거치게 되면 MB-peptide의 말단에 cysteine과 금 전극 간의 thiolate 결합을 통해 금 전극에 고정되게 된다. 다음으로 spacer와 blocking layer 역할을 하는 6-mercapto-1-hexanol (MCH)을 떨어뜨려 50분 동안 반응 시키게 되면 최종적으로 MB-peptide based MMP-2 biosensor를 제작할 수 있게 된다 (그림 10).

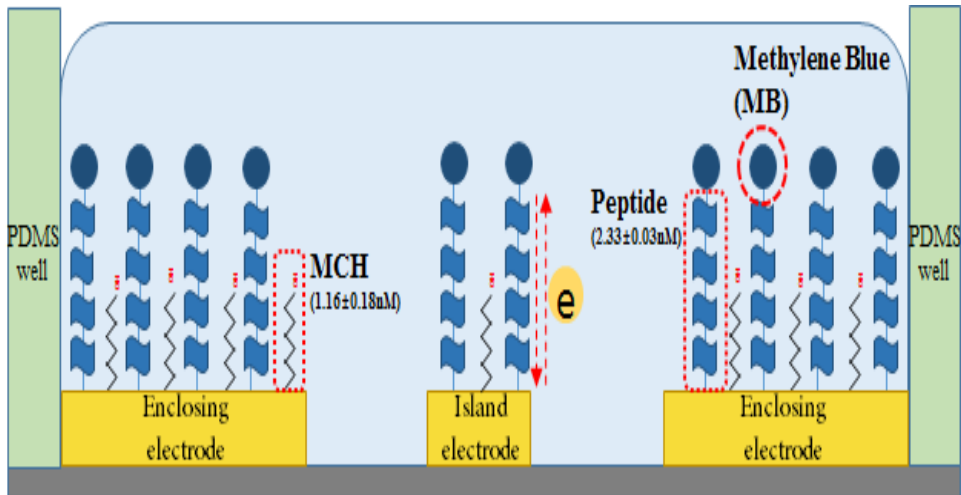
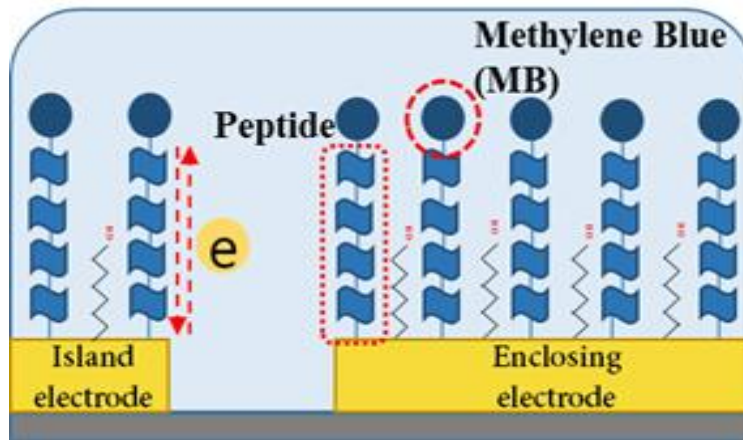
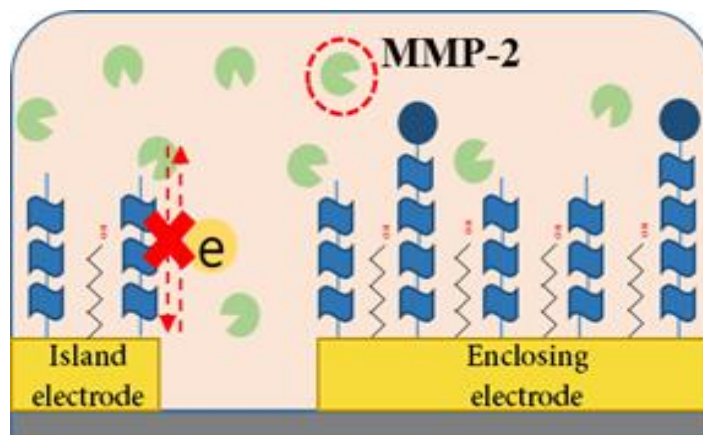


그림 10. MB-peptide based MMP-2 biosensor 모습

sensor로써 제작이 완료되면 peptide에 합성되어 있는 methylene blue에 의해 전자의 tunneling 현상을 측정하여 human serum 속의 MMP-2 농도를 정량적으로 측정하는 원리에 기반하고 있다. MB-peptide가 고정되어 있는 금 전극에 MMP-2가 들어있는 human serum을 넣어주게 되면 peptide의 일부분이 잘려 나가게 되고 peptide에 합성되어 있는 methylene blue 또한 잘려진 peptide와 함께 떨어져 나가게 된다. 따라서 전극과 전자를 주고 받을 수 있는 methylene blue의 개수가 줄어들게 되어 tunneling 전류가 감소하게 되고, 이 전류 감소를 측정하여 human serum 속 MMP-2 농도를 정량적으로 검출 할 수 있다 (그림 11).



(a)



(b)

그림 11. (a) 금 전극에 MB-peptide가 고정화 되어있는 상태,
(b) 고정화된 MB-peptide와 MMP-2의 반응 이후의 상태

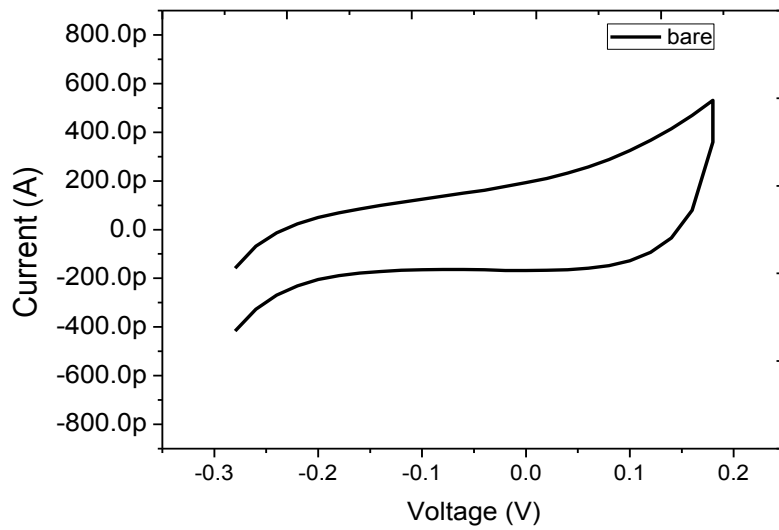
제 3 장 결과 및 분석

3.1 MB-peptide 기반 tunneling biosensor의 전류 특성 분석

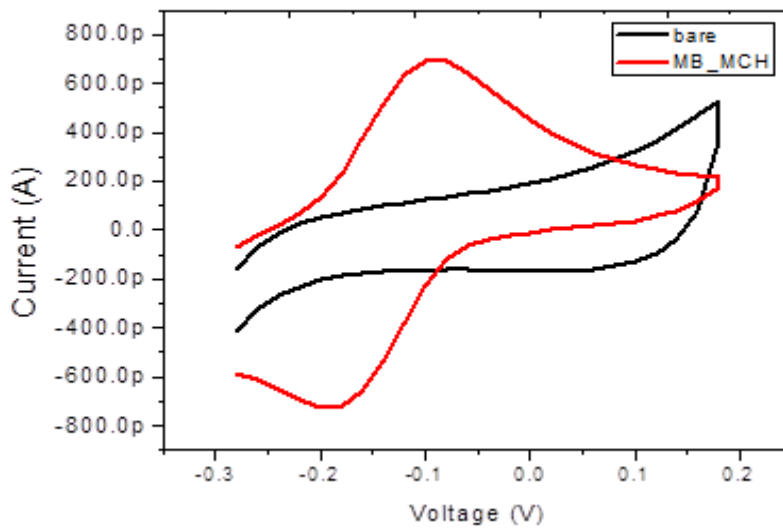
3.1.1.1 Biosensor 제작 과정에 따른 전류 파형 변화 측정

MMP-2를 검출하는 센서로 만들기 위한 과정에서 MB-peptide의 고정화가 제대로 이루어 졌는지 확인해 보았다. 앞에서 설명한 구조의 소자를 이용하여 금 전극 위에 아무것도 없는 상태에서 PBS 용액만 떨어뜨려 전류를 확인해 보았다 (그림 12(a)). Bare 상태에서 전압을 인가 하였을 때에는 전자의 tunneling이 발생할 수 있는 tunneling state가 존재 하지 않기 때문에, 전압 전류 그래프에서 tunneling이 발생할 때 나타나는 peak전류가 나타나지 않았다.

다음으로 전자의 tunneling state 역할을 하는 methylene blue가 합성된 peptide를 12시간 이상 고정화 시키고, 남은 전극 표면을 blocking 하고 spacer 역할을 하는 MCH를 1시간동안 고정화 시킨 후 전류를 측정하면 다음과 같이 전류가 변하게 된다 (그림 12(b)).



(a)



(b)

그림 12. MB-peptide biosensor 제작 과정별 전류 변화 그래프

(a) Bare electrode에서 측정된 전류 그래프,

(b) MB-peptide와 MCH를 고정화 시킨 뒤 측정된 전류 그래프

3.2 전압 인가에 따른 MB-peptide biosensor의 energy state 변화

Bare electrode에서 측정한 전류와 비교하여 금 전극에 MB-peptide를 고정화시킨 후 측정한 전류의 변화에 대해서 energy state를 통해 분석을 해보았다 [24].

본 연구에서는 cyclic voltammetry를 이용해 전류를 측정하였다. 전압은 초기에 -0.3V 로 5초 동안 인가해준 뒤 0.2V 까지 double sweep을 하였고, scan rate는 1 V/sec 로 측정을 진행하였다.

먼저 전압을 인가하기 전의 MB-peptide biosensor의 energy state는 그림 13(a)와 같다. 전압을 인가하지 않은 평형 상태일 때는 MB-peptide가 MB^+ 와 LMB 두 가지 상태로 공존해 있다. 이때 -0.3V 의 전압을 5초간 인가해주면 그림 13(b)와 같이 금 전극의 energy level이 높아지게 되어 금 전극에서 MB^+ 로 전자의 tunneling이 발생하게 되고 결과적으로 biosensor 계면의 상태는 모두 LMB로 바뀌게 된다. 이와 같이 초기 계면의 상태를 MB^+ 와 LMB가 공존하는 상태에서 LMB상태로 바꾼 뒤에 전류 측정을 진행하게 된다.

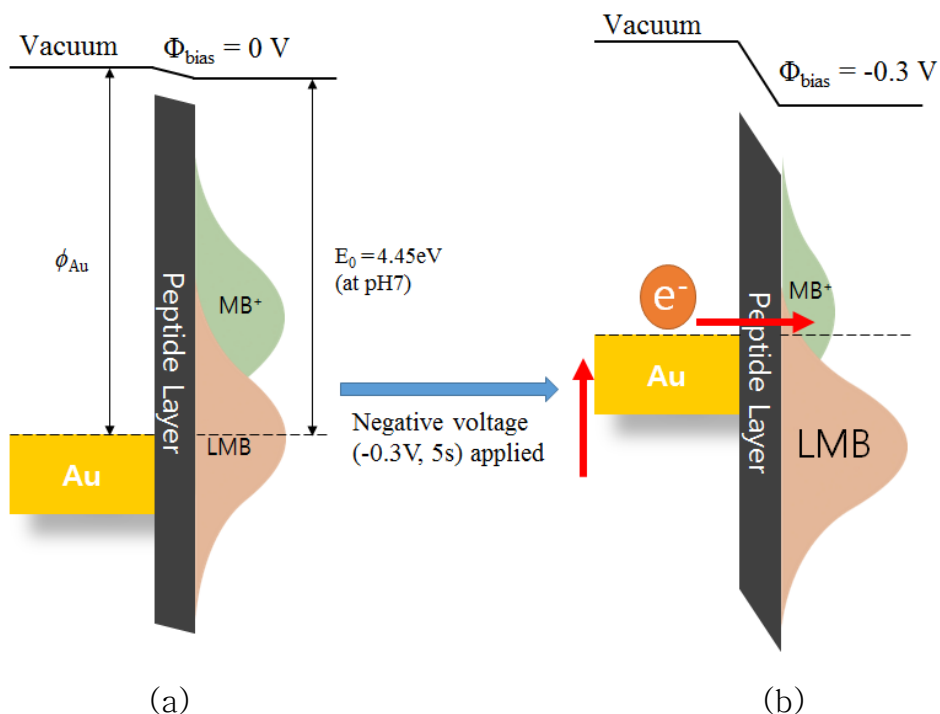


그림 13. MB-peptide biosensor의 energy state (a) 전압이 인가되지 않은 초기 상태, (b) -0.3 V 를 5초 동안 인가한 후의 상태

다음으로 0.2 V 까지 전압을 sweep 하면서 전류를 측정하면 그림 14(b)와 같이 금 전극의 energy level이 낮아 지기 때문에 LMB에서 전극으로 전자의 tunneling이 일어난다. 0.2 V 까지 sweep을 한 이후에는 다시 -0.3 V 까지 전압을 sweep하는데 이 때는 positive voltage sweep을 했을 때와 반대로 전극에서 MB^+ 로의 전자의 tunneling이 일어나게 된다.

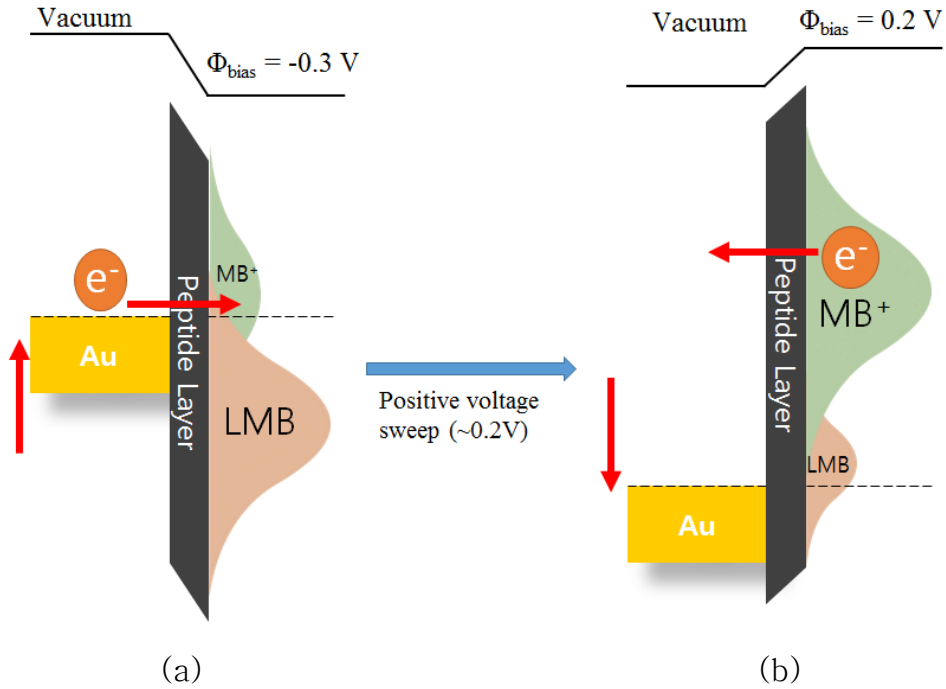


그림 14. MB-peptide biosensor의 energy state

(a) -0.3 V 를 5초 동안 인가한 후의 상태,

(b) 0.2V 까지 positive voltage sweep을 진행한 후의 상태

앞에서 설명한 voltage sweep의 모든 과정을 전류 그래프로 나타내면 그림 15와 같다. 초기에 -0.3V 를 5초동안 인가하여 계면의 상태를 모두 LMB로 바꾼 뒤, 0.2V 까지 positive voltage sweep을 하게 되면 LMB에서 전극으로 전자의 tunneling이 일어나면서 전류가 계속 증가하게 된다. 하지만 계면에 전자를 내어줄 수 있는 LMB가 모두 고갈되면 전류가 감소하게 된다. 0.2V 까지

sweep이 끝난 후 반대로 -0.3V 까지 negative voltage sweep을 하게 되면 전극에서 MB^+ 로 전자의 tunneling이 일어나면서 전류가 증가하고 마찬가지로 전자를 받을 수 있는 MB^+ 가 고갈되면 전류가 감소하면서 그림 15와 같은 전류 파형이 나타나게 된다.

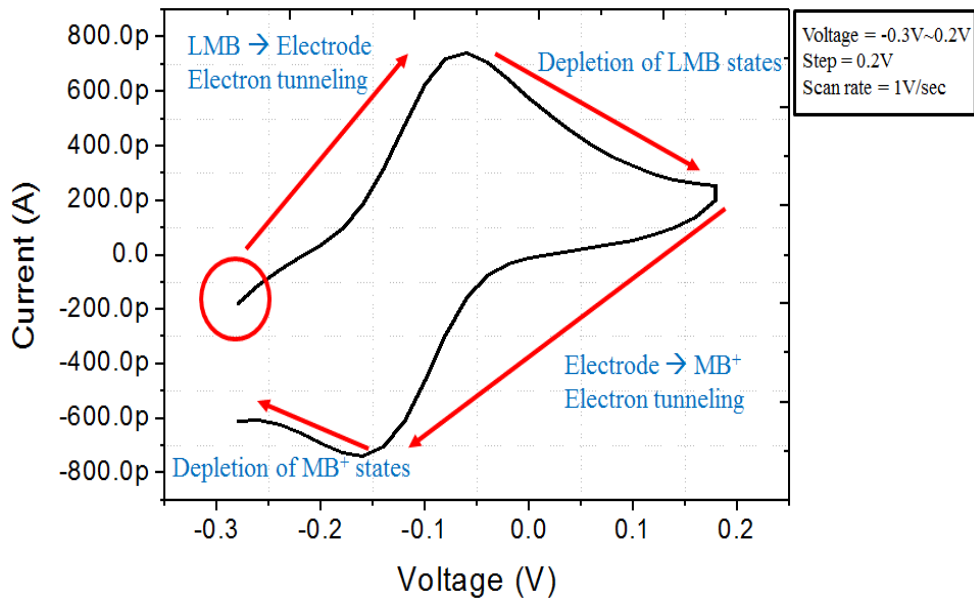
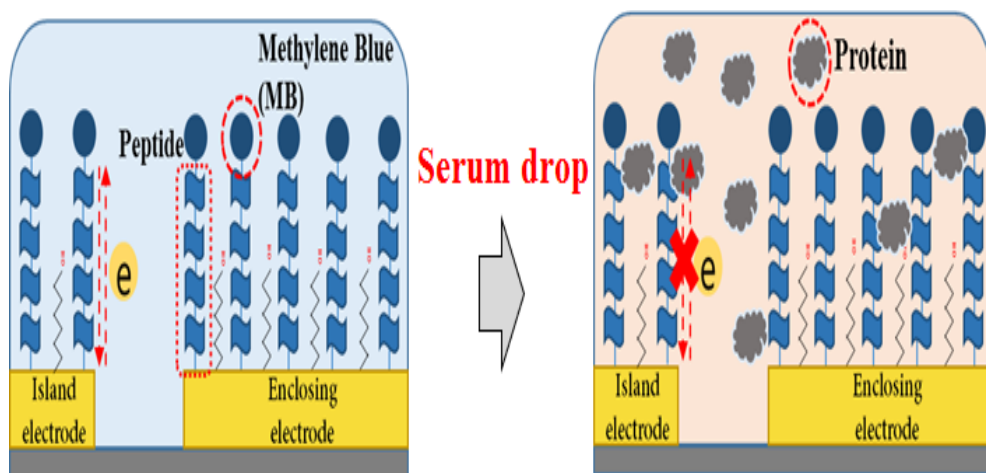


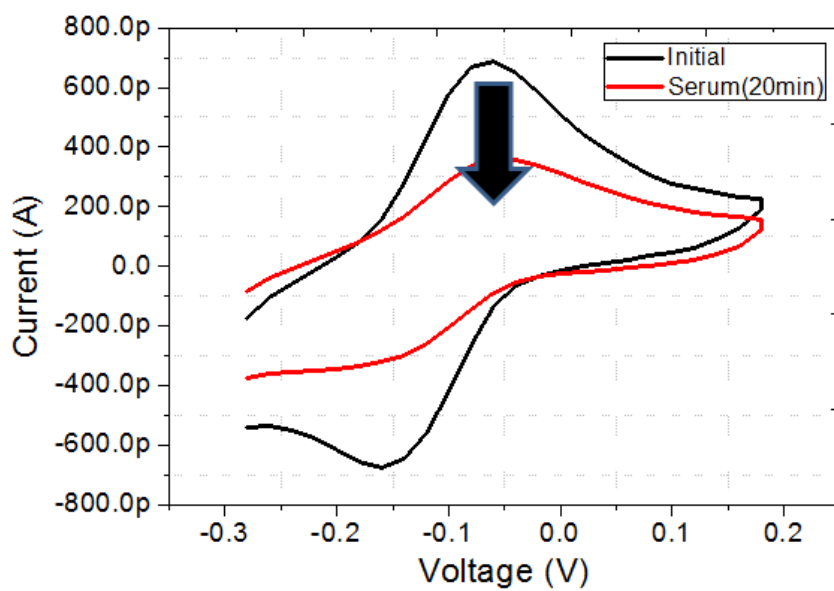
그림 15. Cyclic voltammetry 측정 시, 전압 sweep에 따른 전류 성분 분석

3.3 Human serum 에서의 control 실험

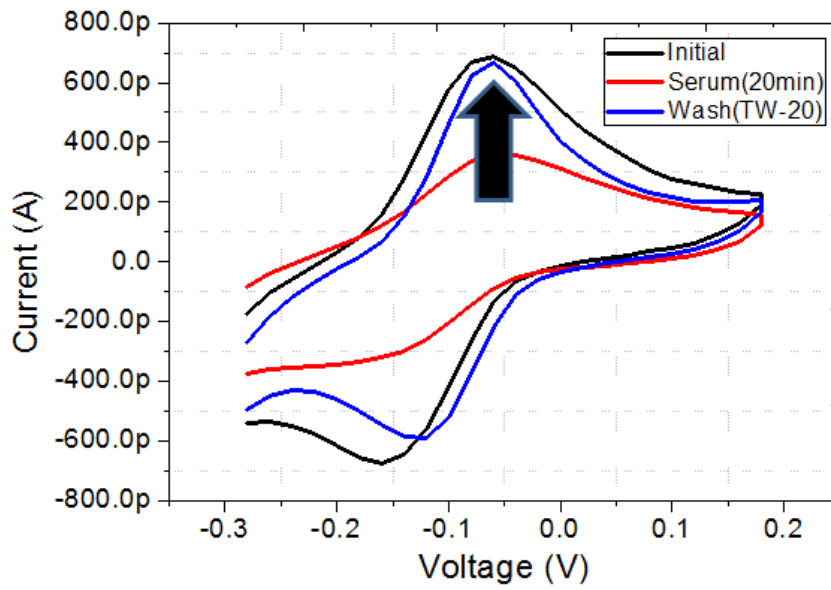
Human serum속에서 MMP-2를 검출하기 위해서는 먼저 control 실험으로 human serum 속에 MB-peptide의 분자 chain을 자르는 물질이 있는지 확인해 보았다. 일반적으로 human serum 속에는 수많은 단백질들이 들어있다고 알려져 있기 때문에 human serum속에서 순수한 MMP-2만의 반응을 확인 하기 위해 아래와 같은 실험을 진행하였다 (그림 16(a)). 먼저 MB-peptide만 있는 initial 상태에서 human serum과 30분간 반응을 시킨 후 전류를 측정해보았다 (그림 16(b)). 그 결과 human serum 속 수많은 단백질에 의해 전극 표면과 Methylene blue 사이에 전자의 이동을 막는 물질들이 존재 하였기 때문에 tunneling current가 감소하는 결과를 얻었다. 감소하는 tunneling current는 MB-peptide가 잘리는 것이 아니라는 것을 증명 하기 위해 non-specific 한 물질을 제거 하는 것으로 널리 알려진 Tween-20 물질을 사용하여 전극에 있는 human serum을 wash 한 후, 다시 측정을 해보았다 (그림 16(c)). 그 결과 전극에 있던 serum 속 단백질들이 씻겨 나가게 됨으로써 초기의 전류 값을 얻게 되었다. Control 실험을 통해서 human serum 속에는 MB-peptide를 자르는 물질이 없다는 것을 증명하게 되었고 이후 실험에서는 human serum 속에 MMP-2를 첨가 하여 실험을 진행 하였다.



(a)



(b)



(c)

그림 16. (a) MB-peptide와 human serum간의 반응, (b) MB-peptide와 human serum을 30분 동안 반응 시킨 후의 전류 그래프, (c) Tween-20으로 wash 후 초기의 전류 값으로 회복되는 그래프

3.4 Human serum 속 MMP-2 농도에 따른 변화

다양한 농도의 MMP-2와 추가로 MB-peptide와 반응하지 않는 물질 (non-specific target)인 urokinase-type plasminogen activator (uPA)를 이용하여 농도 별 peak점에서의 전류 감소율을 측정하였다. 측정은 앞 절에서 실험한 것과 같이 PBS 용액 대비 target을 떨어뜨리고 실시간으로 peak점에서의 전류 변화를 1500초까지 살펴 보았다. 실험에 사용된 target은 총 5개로써, MMP-2가 들어있지 않은 human serum과 MMP-2를 660pM부터 50nM까지 3가지의 농도를 섞은 human serum, non-specific target인 uPA를 100nM 넣은 human serum을 target으로 이용하였다.

그 결과 target molecule을 떨어뜨린 후 약 800초 이후의 반응에서는 전류의 변화가 물질과는 상관없이 일정하게 saturation 되는 결과를 얻을 수 있었다 (그림 17).

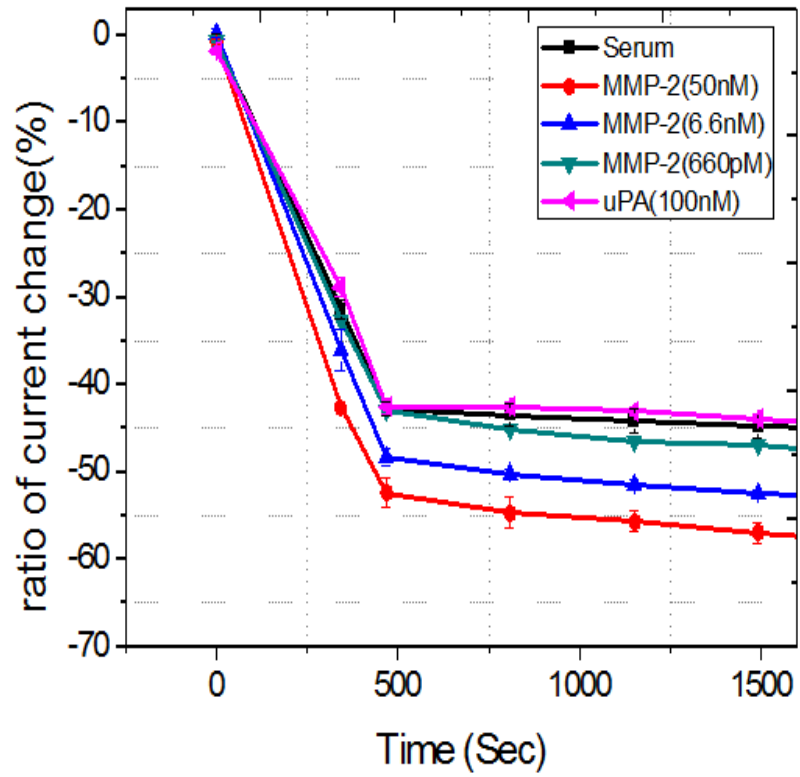


그림 17. 다양한 농도의 MMP-2와 uPA를 떨어뜨린 뒤 peak점에서의 실시간 전류 변화 그래프

1500초까지 반응이 끝난 이후 peak 점에서의 전류 변화를 비교해본 결과, human serum속 MMP-2가 들어있지 않은 것과 non-specific 물질인 고농도의 uPA를 사용하여 측정 시 비슷한 전류 변화를 나타내고 있으며 나머지 MMP-2가 들어있는 human serum에서는 MMP-2의 농도에 따른 전류 변화의 경향성이 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있다 (그림 18). 모든 측정은 농도 별 4회씩 측정을 하였으며 MB-peptide biosensor를 통해 검출 가능한 한계는 660pM 정도가 되는 것으로 확인 할 수 있었다.

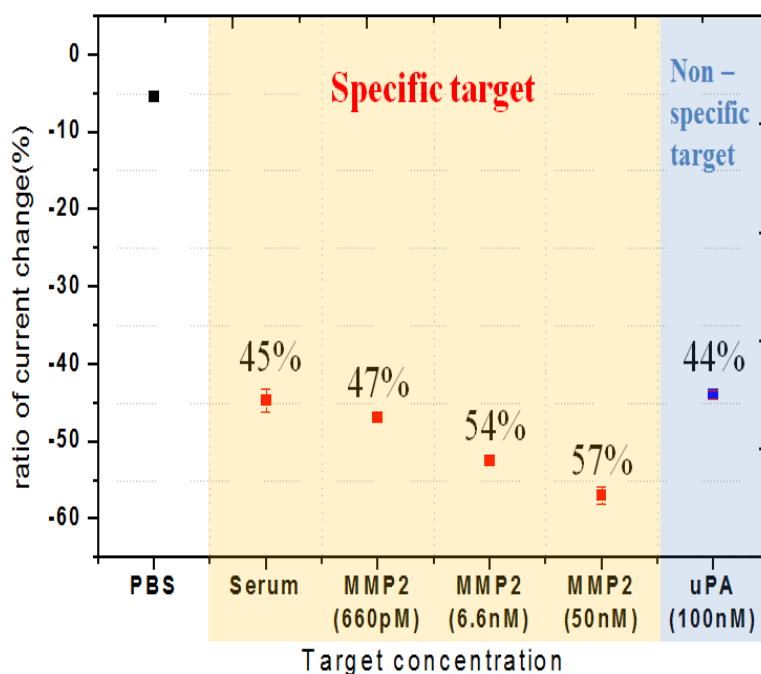


그림 18. 반응이 끝난 이후의 peak점에서의 전류 변화 그래프

제 4 장 결론과 앞으로 연구 제안

본 연구에서는 암의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 MMP-2를 human serum 속에서 검출하는 전기적 tunneling biosensor를 개발하였다. Enclosing electrode의 면적이 island electrode의 면적보다 1,000배 이상 큰, concentric electrode의 구조적 특징을 통해 기준 전극이 없이 두 전극 만을 사용하여 biosensor를 더욱 간단하고 소형화 할 수 있었다.

MMP-2를 검출하기 위하여 특이적으로 반응하는 MB-peptide를 금 전극에 고정화를 통해 안정적인 전압 전류 그래프를 얻을 수 있었다. 이렇게 제작된 바이오센서는 검출한계가 약 660pM 정도로 MMP-2를 검출 할 수 있었고, 다른 물질을 대조 군으로 사용하였을 때 농도에 따른 경향성이 보이지 않는 것까지 확인 하였다.

본 연구를 통해 MB-peptide와 concentric electrode 구조를 이용한 바이오 센서를 통해 peptide와 특이 반응을 하는 물질을 검출할 수 있음을 확인하였으며, 또한 이러한 센서의 특징을 이용하여 MMP-2 뿐만 아니라 다양한 물질을 검출하는 바이오센서로 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구의 목적인 개인 암 진단용 전기 바이오 센서의 응용을 위해서 더 필요한 연구 항목을 제안하면 다음과 같다.

- 다양한 nonspecific target을 이용한 센서의 selectivity 검증
- CMOS 칩의 여러 cell을 활용하여 다양한 바이오마커의 동시 진단

참고 문헌

- [1] J. Wang, Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1887–1892. doi:10.1016/j.bios.2005.10.027.
- [2] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747. doi:10.1039/b714449k.
- [3] 통계청, "2015년 사망자 중 10대암의 사망분율", 통계청
- [4] H. Nagase, J.F. Woessner, *Matrix Metalloproteinases **, (n.d.).
- [5] M. Cell, V. Plaks, K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, Kessenbrock K , Plaks V , Werb Z .. *Matrix metalloproteinases : regulators of the Tumor Review Matrix Metalloproteinases : Regulators of the Tumor Microenvironment*, (2014). doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [6] A. Manuscript, NIH Public Access, 141 (2011) 52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.Matrix.
- [7] A. Page-mccaw, A.J. Ewald, Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*, 8 (2007) 221–233. doi:10.1038/nrm2125.
- [8] E.I. Deryugina, J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*, (2006) 9–34. doi:10.1007/s10555-006-7886-9.
- [9] P. Pa, *Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma*, 2 (2003) 1270–1275. doi:10.1038/sj.bjc.6601238.
- [10] P. Srivastava, R. Kapoor, R.D. Mittal, *Influence of Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms in Healthy North Indians Compared to Variations in other Ethnic Groups Worldwide*, 10 (2009) 2007–2010.
- [11] E.T. Cytobiologica, M. Groblewska, B. Mroczko, M. Gryko, B. Kêdra, M. Szmitkowski, *Matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 2 in the diagnosis of colorectal adenoma and cancer patients*, 48 (2010) 564–571. doi:10.2478/v10042-010-0076-1.
- [12] M. Groblewska, B. Mroczko, M. Gryko, *Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients*, 2 (2014) 3793–3802. doi:10.1007/s13277-013-1502-8.
- [13] V. Ka, *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*, 13 (2017) 781–792.
- [14] K. Nabeshima, T. Inoue, Y. Shimao, T. Sameshima, *Matrix metalloproteinases in tumor invasion : Role for cell migration*, (2002).

- [15] S.L. Parsons, S.A. Watson, H.M. Collins, N.R. Griffin, P.A. Clarke, R.J.C. Steele, Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy, 78 (1998) 1495–1502.
- [16] H. Ura, R.D. Bonfil, R. Reich, R. Reddel, A. Pfeifer, C.C. Harris, A.J.P. Klein-szanto, Expression of Type IV Collagenase and Procollagen Genes and Its Correlation with the Tumorigenic , Invasive , and Metastatic Abilities of Oncogene-transformed Human Bronchial Epithelial Cells¹, (1989) 4615–4622.
- [17] S. Afzal, E. Lalani, R. Poulson, A. Stubbs, G. Rowlinson, H. Sato, M. Seiki, G.W.H. Stamp, MTI-MMP and MMP-2 mRNA Expression in Human Ovarian Tumors : Possible Implications for the Role of Desmoplastic Fibroblasts, (n.d.) 155–165.
- [18] T. Sato, T. Sakai, Y. Noguchi, M. Takita, Tumor – stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases, 92 (2004) 47–56.
doi:10.1016/j.ygyno.2003.09.012.
- [19] M. Bérubé, A. Deschambeault, M. Boucher, L. Germain, E. Petitclerc, L. Sylvain, MMP-2 expression in uveal melanoma : differential activation status dictated by the cellular environment, (2005).
- [20] L.A. Di Nezza, A. Misajon, M. Sc, J. Zhang, B. Sc, T. Jobling, M.A. Quinn, A. Lopata, D. Ph, L.A.S.P. D, Presence of Active Gelatinases in Endometrial Carcinoma and Correlation of Matrix Metalloproteinase Expression with Increasing Tumor Grade and Invasion, (2002) 1466–1475. doi:10.1002/cncr.10355.
- [21] O.S. Chiraldi, S.A. Ntonaci, CLINICAL ROLE OF MMP-2 / TIMP-2 IMBALANCE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA, 431 (2002) 425–431. doi:10.1002/ijc.1635.
- [22] D.W. Kim, G.S. Choe, S.M. Seo, J.H. Cheon, H. Kim, J.W. Ko, I.Y. Chung, Y.J. Park, D.W. Kim, G.S. Choe, S.M. Seo, J.H. Cheon, H. Kim, J.W. Ko, I.Y. Chung, Y.J. Park, Self-gating effects in carbon nanotube network based liquid gate field effect transistors Self-gating effects in carbon nanotube network based liquid gate field effect transistors, 243115 (2008) 1–4. doi:10.1063/1.2978095.
- [23] J.H. Cheon, J. Lim, S.M. Seo, J. Woo, S.H. Kim, Y. Kwon, J.W. Ko, T.J. Kang, Y.H. Kim, Y.J. Park, S. Member, Electrical Characteristics of the Concentric-Shape Carbon Nanotube Network Device in pH Buffer Solution, 57 (2010) 2684–2689.
- [24] N. Sato, Electrode reactions in electron transfer, in: *Electrochem. Met. Semicond. Electrodes*, Elsevier, 1998: pp. 235–288.
doi:10.1016/B978-044482806-4/50008-8.

Abstract

Detection of MMP-2 in human serum as the biomarker of colorectal cancer using the T-chip plat form

YongEun Lee

Department of Electrical and Computer Engineering

The Graduate School

Seoul National University

We report a method for electrochemical measurements of the matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the human serum as the biomarker of various cancers using the T-chip platform. The T-chip platform is an electrochemical biosensor consisting of two metal electrodes; island electrode and enclosing electrode. The enclosing electrode is ca. 1000 times larger than island electrode, thereby the serum electrolyte is electrically stabilized.

The peptide labeled with methylene blue (MB) specific to MMP-2 was immobilized on an Au electrode using thiol group, in which the MB was used as a redox reporter representing

the decrease in the redox currents when MMP-2 molecules cleave peptides. Our result showed that the electrical signal reduction was found for the concentration in the range from 660 pM to 50 nM which is below the cutoff frequency as the biomarker of various cancers.

Keywords : MMP-2, methylene blue, human serum, biosensor, tunneling current

Student Number : 2015-22801